УДК 581.69-636.03

Г.Т. Акиншина, Л.П. Дьяконов, Т.В. Гальнбек
Институт паразитологии РАН, ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко (ВИЭВ) РАСХН

РОЛЬ ИЗМЕНЧИВОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТОКСОПЛАЗМОЗА (TOXOPLASMA GONDII, SPOROZOA) В РЕАЛИЗАЦИИ ЕГО ПАТОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА

Генетическая характеристика токсоплазм (Toxoplasma gondii) и других патогенных простейших служит не только выражением их наследственных свойств, но и критерием их изменчивости. Изучение генетических признаков необходимо также для установления взаимосвязей между признаками, определяемыми in vivo и in vitro, а также в ряде случаев для анализа степени аттенуации штаммов паразитических простейших, их стабильности и ряда других вопросов.

Рассматривая клетку как среду обитания для облигатного внутриклеточного паразита – «цитоэкосистему» [2] – к числу экологических факторов можно отнести химиотерапевтические препараты, температурные воздействия , смешанные инфекции, трансформацию в раковые клетки и др. факторы, приводящие к существенным изменениям в структуре популяции штаммов.

Одним из подходов к выяснению факторов, определяющих патогенез острого и хронического токсоплазмоза на клеточном уровне, является изучение спектра изменчивости самого возбудителя. Об этом свидетельствуют также многочисленные штаммы токсоплазм, выделяемые от людей и животных в различных частях земного шара и характеризующихся различной вирулентностью [8, 9, 10, 11, 12, 13 и др.].

Условия существования в природе вирулентных, маловирулентных и авирулентных штаммов, возможность взаимопереходов [5, 6, 7] степень адаптации разных штаммов токсоплазм к организму хозяина, неясные механизмы многообразия клинических проявлений токсоплазмоза – эти и ряд других вытекающих отсюда вопросов заставляют нас особенно детально изучать изменчивость токсоплазм и, в частности, их внутри- и межштаммовые различия, что весьма важно для понимания многих вопросов клиники, диагностики, эпидемиологии, химиотерапии и др.

Изучение биологических свойств токсоплазм на моделях клеточных культур вполне оправдало себя в силу совершенно особых их свойств как облигатных внутриклеточных паразитов [2]. В частности, наши эксперименты по моделированию и исследованию паразито-хозяинных отношений при острой и хронической инфекциях в клеточных системах [4, 5, 6] определили ряд свойств паразита в системе паразит - клетка(хозяин), связанных с различиями в вирулентности разных штаммов , включая свежеизолированные: способы проникновения в клетку, типы деления токсоплазм, продолжительность одной генерации паразита, цитопатогенное действие и др. Однако и в этих условиях изучение изменчивости токсоплазм в плане штаммовых различий осложняется тем, что мы имеем дело с популяцией паразитов, неоднородных по своим биологическим и генетическим свойствам. Действительно, анализируя работы, опубликованные в этом направлении и собственные данные, мы видим, что различия в ритме размножения между вирулентным и маловирулентными штаммами значительны, однако даже внутри одного штамма часто наблюдается некоторая вариабельность ритма размножения [2]. Совершенно естественно, что интерпретация этих фактов может быть многоплановой и связанной не только с природой изменчивости самого паразита. Тем не менее, закономерно возникает необходимость изучения такой вариабельности токсоплазм не на популяциях токсоплазм, а на отдельных клонах или чистых линиях, полученных от одной токсоплазмы.

Обнаружение не только межштаммовых, но и внутриштаммовых различий привело нас к использованию клонального анализа свежевыделенных от человека и животных штаммов. С этой целью метод бляшек(негативных колоний) в нашей модификации [1] впервые применен для клонирования токсоплазм лабораторного штамма в естественных условиях внутриклеточного размножения , изучения генетических свойств в аспекте изменчивости

возбудителя , состава популяций штамма и возможной корреляции признака патогенности in vivo с признаками, изучаемыми в опытах in vitro . На эталонном лабораторном штамме RH (более 40 лет пассированном в лаборатории) нами ранее было показано, что популяция токсоплазм состоит из паразитов с неодинаковой степенью патогенности для белых мышей при интраперитонеальном пути заражения [1, 2]. Не было установлено корреляции между признаком патогенности и размером бляшек, образуемых токсоплазмами под агаром. При постановке метода бляшек в разных температурных режимах выяснено, что токсоплазмы обладают способностью размножаться под агаром при непермиссивной температуре (42° С) и некоторые др. Изученные генетические признаки токсоплазм старого лабораторного штамма могут служить контролями при сравнительном изучении свежевыделенных штаммов.

Целью проведения данного экспериментального исследования было сравнительное изучение клонального состава популяций свежеизолированных от человека и животных штаммов токсоплазм, выделения чистых линий из популяций данных штаммов и изучение их по показателям морфологической характеристики образуемых бляшек (S-признак) и вирулентности для белых мышей при интраперитонеальном пути заражения; изолирование клонов разной вирулентности и изучения их по следующим признакам in vitro: инвазионность, ритм размножения и степень цитопатогенного действия в клеточных культурах. Предполагалось также установление степени корреляции признаков in vitro с таковыми in vivo, в частности признаком патогенности для белых мышей.

Материалы и методы

Возбудитель и штаммы. Были использованы 3 штамма разной вирулентности для белых мышей Swiss: штамм «Р», вирулентный, изолированный от 2-месячного ребенка с гидроцефалией и некротическим энцефалитом (Чехия, д-р Zoster M.); штамм МА, маловирулентный, изолированный от зайца в Чехии; штамм АЖ-4, изолированный нами из крови ребенка при реактивации врожденного токсоплазмоза.

Клеточные культуры. После скрининга разных гетероплоидных линий клеток были отобраны первичные культуры клеток эмбриона свиньи (ПЭС), перевиваемая линия клеток легкого эмбриона коровы (ЛЭК), первичные культуры куриных фибробластов (КФ).

Заражение клеточных культур проводилось эндозоитами из перитонеального экссудата мышей, зараженных интраперитонеально эндозоитами или цистозоитами разных штаммов в соотношении паразитов и клеток 1:10.

Цитологические препараты фиксировались и окрашивались в динамике развития инфекции по разработанной нами ранее методике [2] и просматривались в световом микроскопе с использованием иммерсионного объектива и фазово-контрастного устройства.

Метод бляшек (негативных колоний) в нашей модификации для исследования мутаций токсоплазм разработан и описан нами ранее [1].

Результаты и обсуждение

Было проведено сравнительное изучение популяций 3х свежеизолированных от человека и животных штамма (МА, АЖ-4, Р) с точки зрения возможной разнокачественности этих популяций по признакам размера бляшек (S-признак) и патогенности для белых мышей при интаперитонеальном пути заражения. Данный набор штаммов был обусловлен проявлением этими штаммами разной степени патогенности для белых мышей и клеточных культур.

Изучение популяций вышеперечисленных штаммов токсоплазм показало, что бляшки, образуемые ими под агаром, имели ряд общих признаков: округлую форму, четкие края и одинаковый размер в момент появления (0,2-0,3 мм), который увеличивался в соответствии с длительностью инкубации до 1,0-1,1 мм, как и в популяции лабораторного штамма RH. Однако появление негативных колоний у 3 свежеизолированных штаммов не было одновременным: меньшая часть бляшек (0-30% - в зависимости от штамма) обнаруживалась, как обычно, через 4-6 суток после заражения, а большинство бляшек появлялось через 12-14 дней после инфицирования монослоя, что было связано с более длительной lag-фазой и более медленным темпом размножения этих клонов.

С целью исследования возможной взаимосвязи обнаруженных различий и состава популяций по признаку патогенности для белых мышей и культур клеток проведено изучение составляющих их клонов, для чего изолировались все бляшки с каждого флакона соответствующего десятикратного разведения инокулюма. Таким образом, было изолировано 112 клонов штамма МА, 72 клона – АЖ-4 и 57 клонов виру-

лентного штамма Р. Предварительное титрование указанных клонов по признаку патогенности для белых мышей при интраперитонеальном пути заражения выявило разную вирулентность изолируемых бляшек – клонов, что показано в сводной таблице (табл. 1).

Таким образом, в популяции штамма МА удельный вес сильновирулентных клонов составлял 60,7%, в популяции штамма АЖ-4 – 0%, а в популяции штамма Р – 87,7%. Не обнаружено корреляции размера бляшек и признака патогенности для белых мышей при интраперитонеальном пути заражения (r=0,117, с вероятностью 99%).

Следующим этапом было изучение отличающихся по вирулентности клонов с точки зрения уже аппробированных нами признаков для лабораторного штамма RH: инвазионности, ритма размножения и характера цитопатогенного действия.

Учитывая обнаруженную особенность культур КФ и ЛЭК сохранять вышеуказанные признаки in vitro стабильными в процессе пассирования на данных клеточных системах, клоны были предварительно накоплены в данных клеточных системах, что обеспечило также возможность дозирования инокулированных паразитов.

Инвазионность токсоплазм каждого клона оценивалась по количеству инфицированных клеток через 6 часов после заражения; ритм размножения – по количеству токсоплазм на одну инфицированную клетку через 6 и 19 часов после заражения; цитопатогенное действие оценивалось по 4ˣ бальной системе, где ЦПД на 4+ означало разрушение основной массы клеток, а 2+ - разрушение 50% клеток.

В таблицах 1 и 2 приведены данные по анализу некоторых из изученных клонов на примере маловирулентных для мышей Swiss штаммов МА и АЖ-4 в соответствии с вышеуказанными признаками.

Подсчет проводился на 200 клеток культур ЛЭК или КФ(по 10 полей зрения при увеличении 90х10) каждого из 3ˣ препаратов в 3ˣ экспериментах в соответствующие сроки (всего на 1800 клеток).

Данные таблицы 2 приведены в качестве примера, детализирующего данные табл.1 по характеристике 59 клонов штамма МА, обнаруживших разную степень патогенности для белых мышей и культур клеток ЛЭК.

На основании полученных все изученные клоны маловирулентного для мышей штамма МА могут быть разделены на 3 группы по всем исследованным признакам in vitro и in vivo (форма и размер бляшек, цитопатогенное действие в клеточной культуре ЛЭК и патогенность для белых мышей Swiss):

I группа включает 24 клона (№ 9 и др., № 49 и др., № 57 и др.), образующие мелкие бляшки округлой формы с четкими краями, не вызывающие ЦПД в культурах КФ и ЛЭК и авирулентные при интраперитонеальном пути заражения мышей (100% выживание мышей в течение срока наблюдения 10-14 месяцев).

II группа включает 6 клонов (№ 19 и др., № 28 и др.), образующих мелкие округлые бляшки с четкими границами, вызывающих частичное ЦПД в культурах КФ и ЛЭК (0 - 1+), проявляющих незначительную патогенную активность для белых мышей (гибель единичных мышей (2) через 1 – 1,2 месяца с наличием цист в головном мозгу).

III группа включает 29 клонов (№ 8 и др., № 32 и др., № 33 и др., № 110 и др.), образующих мелкие округлые бляшки с четкими контурами, вызывающих выраженное ЦПД в культурах КФ и ЛЭК (3 – 3+) и обладающих высокой патогенностью для белых мышей (100% гибель через 7-11 дней).

Однако, как и на модели лабораторного штамма RH, мы не обнаружили связи разной патогенной активности указанных выше клонов и количества инокулированных паразитов. Более того, развитие хронического течения инфекции у мышей и в

Таблица 1

Клональный состав популяций штаммов токсоплазм МА, АЖ-4 и Р по признаку размера бляшек и вирулентности клонов для белых мышей (Учет бляшек: 11 сутки после заражения)

Штаммы	Пассаж после изолирования штамма	Общее кол-во изолированных клонов	Кол-во сильно-вирулентных клонов	Кол-во мало вирулентных клонов	Средний размер бляшек, мм	
					сильно-вирулентные клоны	мало-вирулент-ные клоны
МА	VI	112	78	34	1,1	0,78
АЖ-4	I	72	0	72	-	0,95
Р	II	57	50	7	1,15	1,1

Таблица 2

Цитопатогенная активность 59 клонов T. gondii штамма МА в культуре ЛЭК и их патогенность для белых мышей

№№ клонов	Кол-во инокулированных токсоплазм (мл)	Интенсивность ЦПД	Патогенность для мышей	Сроки гибели мышей (сутки)	Время наблюдения мышей (мес.)
8 (7, 11, 20, 21, 34, 82)	5x10^2	4+	5/5^{xx}	7-8	
9 (2, 4, 15, 24, 27, 31)	5x10^2	0	0/5		10-11
19 (44, 71)	4x10^3	0-1+	0/5^{xxx}		1-18
28 (64, 108)	2x10^3	0-1+	0/5^{xxx}	1,2-13	1,2-13
32 (1, 3, 10, 12, 14, 22, 26, 93, 107)	2x10^2	4+	5/5^{xx}	10-11	
33 (5, 6, 35, 46, 47)	2x10^2	3-4+	3/3	11-12	
49 (45, 53, 65, 70, 73, 84, 103, 109, 111, 112)	1,3x10^3	0	0/4		12-14
57 (60, 75, 83, 94, 95)	2x10^2	0	0/5		11-14
110 (13, 16, 17, 18, 30)	5x10^3	2-3+	5/5^{xx}	9-10	

$^{x)}$ числитель — число погибших мышей (для каждого клона), знаменатель — число зараженных мышей (для каждого клона)
$^{xx)}$ клоны 11, 34, 82, 26, 93, 107, 16, 17, 18 – 3/3
$^{xxx)}$ клоны 71 и 64 – 1/5; мыши погибали только через 1-1,2 месяца с наличием цист в головном мозгу; ЦПД в ЛЭК – 1+

культурах клеток отмечалось нередко при введении такого же (клоны 9, 2, 4, 15, 24, 27, 31) или даже большего количества эндозоитов (клоны 19,28,49 и соответствующие 14 клонов – в скобках), чем таковое обеспечивающее острое течение токсоплазмоза (клоны 8, 32, 33 и соответствующие 20 клонов – в скобках). Только патогенная активность клонов №№ 57, 60, 75, 83, 94, 95, и 110, 13, 16, 17, 18, 30 может, в какой-то степени обусловливаться различиями в дозировке инокулюма.

Таким образом, патогенная активность клонов и полученных из них чистых линий штамма МА, видимо, не находятся в прямой зависимости от

количества инокулированных паразитов, что не отрицает важной роли дозы инокулюма при оценке вирулентных свойств свежеизолированных штаммов. Популяции последних могут быть исходно гетерогенны и не исключается также возможность присутствия в выделяемой популяции более, чем одного, штамма.

Сравнительное исследование свойств инвазионности и ритма размножения изолируемых клонов и чистых линий проводилось на моделях штаммов МА и АЖ-4, причем количество инфицированных клеток (инвазионность) подсчитывалось через 6 часов после заражения, а количество токсоплазм на одну клетку – через 19 часов (штамм МА) и 24 часа после заражения (штаммАЖ-4), что обусловливалось различиями в lag-фазе этих 2^x штаммов.

Анализируя клоны штамма МА соответственно изучаемым сравниваемым признакам эталонного лабораторного штамма RH (табл. 3), можно выделить следующие 4 группы клонов:

1. клоны (116, 17, 18, 19), имеющие примерно одинаковый ритм, но сниженную инвазионность;
2. клоны (20, 21, 23, 25, 29, 30, 32) с одинаковой инвазионной способностью, но сниженным ритмом размножения;
3. клоны (13, 14, 22, 26) – наиболее инвазионные и отличающиеся максимальным ритмом деления.
4. клоны (15, 24, 27, 28, 31) – с очень низкой инвазионностью и еще не размножающиеся в указанные сроки.

3^я группа культуральных линий штамма МА проявляла свойства вирулентного штамма RH – наиболее выраженную патогенную активность для белых мышей, вызывая их гибель через 7-10 дней после заражения с образованием большого количес-

тва (3-5x10[6]) эндозоитов в перитонеальном эксудате мышей. Изучаемые клоны обладали стабильными свойствами в указанных условиях культивирования в культуре ЛЭК в течение 6-9 пассажей, что контролировалось на всех пассажах заражением белых мышей и титрованием методом бляшек.

Заключение

Таким образом, на основании метода негативных колоний, впервые разработанного нами как метод клонирования токсоплазм, была показана гетерогенность клонального состава популяций 3-х свежеизолированных штаммов токсоплазм разной вирулентности от естественно зараженных людей и животных.

Впервые гетерогенность структуры популяций свежеизолированных штаммов была подтверждена не только разной вирулентностью для мышей составляющих их клонов, но и корреляцией признака патогенности с рядом биологических и генетических признаков, тестируемых в клеточных системах in vitro(размер бляшек - S признак, инвазионность, продолжительность поколения).

Таблица 3

Инвазионность и ритм размножения эндозоитов в культуре КФ (на примере штаммов МА и АЖ-4)

№№ клонов		Количество инфицированных клеток (в%)		Количество эндозоитов на 1 инфицированную клетку	
МА	АЖ-4	МА	АЖ-4	МА	АЖ-4
13	1	51,3	5,0	2,0	1,1
14	2	43,3	7,6	2,5	1,4
15	3	3,23	1,0	1,0	1,0
16	4	25,8	1,6	1,8	1,1
17	5	31,3	13,3	2,2	1,1
18	6	37,1	1,3	2,1	1,0
19	7	30,0	2,0	1,4	1,0
20	8	53,6	1,3	1,4	1,0
21	9	53,6	0,13	1,6	1,03
22	10	77	3,0	2,2	1,03
23	11	62,5	1,3	1,1	1,03
24	12	1,6	0,6	1,0	1,0
25	13	44	12,3	1,2	1,03
26	14	62	1,3	2,0	1,0
27	15	4	0,6	1,01	1,1
28	16	3,3	1,0	1,03	1,03
29	17	42,6	1,6	1,1	1,0
30	18	44	1,6	1,3	1,2
31	19	1,3	2,0	1,0	2,0

Литература

1. Акиншина Г.Т., Засухина Г.Д. Метод исследования мутаций Toxoplasma gondii. Ж. Генетика, 1966, с.71-75.
2. Акиншина Г.Т. Система паразит-клетка (хозяин): морфофункциональный анализ и моделирование развития возбудителя токсоплазмоза и некоторых других внутриклеточных паразитических простейших. Автореф. докт.дисс.1983.
3. Akinshina G., Alimov A., Bykovsky A. Toxoplasma gondii: Ultrastructural aspects of strain differences // ICOPA XI, Salzburg, Austria, 2001, P. 42.
4. Акиншина Г.Т., Алимов А.Г., Гальнбек Т.В. Цитоэкологические механизмы реализации потенциала патогенности облигатного внутриклеточного паразита Toxoplasma gondii(Sporozoa) при моделировании in vitro в клеточных системах. // «Теоретические и прикладные аспекты паразитологии». М: Наука, 2002. С. 6-15 (ИНПА РАН ; Т. 43).
5. Акиншина Г.Т., Алимов А.Г., Гальнбек Т.В. Персистенция облигатного внутриклеточного паразита в клеточных системах: цитоэкологические механизмы взаимотрансформаций штаммов разной вирулентности // « Успехи общей паразитологии». М.: Наука, 2004. С. 45-52; (ИНПА РАН; Т. 44).
6. Акиншина Г.Т., Алимов А.Г., Давидович Г.Н., Гальнбек Т.В. К методологии изучения биологических маркеров штаммов возбудителей токсоплазмоза (Toxoplasma gondii, Sporozoa) // «Успехи общей паразитологии». М.: Наука, 2004. С. 53-64 (ИНПА РАН, Т. 44).
7. Акиншина Г.Т., Мовсесян С.О., Алимов А.Г. К проблеме вирулентности циркулирующих в

природе штаммов возбудителя токсоплазмоза (Toxoplasma gondii, Sporozoa) // « Исследование и охрана животного мира южного Кавказа». Ереван, 2004. С. 22-24.
8. Aspock H. National programmes on the prevention of congenital toxoplasmosis. WHO. Working group on Toxoplasmosis 1984.
9. Dubey J., Graham D., Dahl E. et al. Toxoplasma gondii isolates from free - ranging chickens from the United States. J. Parasitol., 2003, 89, 5, 1060-1062.
10. Dubey J., Navarro I.,Sreekumar C. et al. Toxoplasma gondii infections in cats from Parana, Brazil: seroprevalence, tissue distribution, and biologic and genetic characterization of isolates. J. Parasitol., 2004, 90, 4, 721-726.
11. Hill D., Chirukandoth S., Dubey J. Biology and epidemiology of Toxoplasma gondii in man and animals. Anim. Health Res. Rev. 2005, 1, 41-61.
12. Luder C., Bohne W., Soldati D. Toxoplasmosis: a persisting challenge. Trends Parasitol, 2001, 10, 460-463.
13. Report on the WHO working group meeting on toxoplasmosis vaccine development and technology. WHO. Fontefraud, France. 1992.

УДК 616-07:636.7(076)

Е.Ю. Антонен

ФГОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины», Государственное учреждение Санкт-Петербургская государственная ветеринарная лаборатория

ОСОБЕННОСТИ ОТБОРА ПРОБ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ОТ СОБАК ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Введение

В ветеринарной лабораторной практике бактериологическая диагностика (микробиологический анализ) занимает одно из главных мест.

Обнаружение патогенных микробов в присланных пробах имеет решающие значение в выяснении причин болезни и дает основание для постановки диагноза и проведения целенаправленных противоэпизоотических мероприятий.

Конечной целью микробиологического анализа является идентификация выделенной чистой культуры микроорганизмов, т.е. точное определение их видов.

Правила взятия, хранения, и транспортировки биологического материала от животных для проведения бактериологического исследования описаны в различных учебных пособиях и справочникам по микробиологии, регламентированы Методическими указаниями по лабораторной диагностике отдельных бактериальных инфекций.

Однако специалисты ветеринарных лабораторий в повседневной работе довольно часто отмечают, что биологический материал для исследования, был взят недостаточно квалифицированно. Это может привести к искажению результатов исследования и даже к невозможности проведения микробиологического анализа.

Данное пособие призвано устранить затруднения практикующих ветеринарных специалистов при взятии проб клинического материала от мелких животных, а также при оформлении сопроводительных документов.

Материал для микробиологических исследований

Материал от больных животных отбирают с целью изучения **этиологической** роли микроорганизмов в возникновении инфекционного процесса. В зависимости от локализации и клинических форм поражений исследованию подвергаются: пробы крови, мочи, молока, фекалий, рвотных масс, гной и пунктаты из закрытых полостей, гной и отделяемое с раневых поверхностей (дренажи и т. п.) ран, выделения из наружных половых органов (влагалища, препуция), из глаз, из ушей, из носовой и ротовой полостей, промывные воды желудка и т. д.

Материал необходимо брать непосредственно из патологического очага. При вероятности возникновения сепсиса необходимым является одновременный забор крови.

Правила отбора проб клинического материала для бактериологических исследований

Разнообразие материала и своеобразие микрофлоры отдельных тканей требует применения определенных методических приемов отбора проб.

1. Материал от больных животных необходимо брать до лечения антибактери-